

统计优化软件”进行数据处理,优化的工艺参数经验证试验结果表明,科学可信,重现性好。实验结果表明,以粒径 600~400 μ m 的微粒为母丸,采用粉末层积式离心造粒法,在优化条件下可制得表面较为光滑、圆整度较高的麝香保心微丸,期望粒径 1 000~700 μ m 的微丸收率可达 90.4%。

References

- [1] Wang S Y, Dai R H, Jin C, *et al.* Clinical observation of Shexiang Baoxin Wan for treatment of coronary heart disease with angina pectoris [J]. *Chin J Integrated Tradit Chin West Med* (中国中西医结合杂志), 1996, 16(12): 717-720.
- [2] Song H T, Guo T, Li L, *et al.* Dissolution of borneol in Shexiang Baoxin Wan *in vitro* [J]. *Pharm J Chin PLA* (解放军药学报), 1999, 15(2): 17-21.
- [3] Song H T, Guo T, Zhang R H, *et al.* Studies on the prepara-

- tion of cinnamom oil β -cyclodextrin inclusion complex [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2000, 31(11): 818-820.
- [4] Song H T, Guo T, Zhang R H, *et al.* The preparation of borneol β -cyclodextrin inclusion complexes [J]. *J Shenyang Pharm Univ* (沈阳药科大学学报), 2000, 17(3): 170-173.
- [5] Song H T, Guo T, Yan X T, *et al.* Study on the preparation of styrax β -cyclodextrin inclusion complexes [J]. *Chin J Hosp Pharm* (中国医院药学杂志), 2001, 21(3): 143-145.
- [6] Rashid H A, Heinamaki J, Antikainen O, *et al.* Effects of process variable on the size, shape and surface characteristics of microcrystalline cellulose beads prepared in a centrifugal granulator [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 1999, 25(5): 605-611.
- [7] Yu S Y, Wang H G, Liu L, *et al.* Progress of pellets [J]. *Chin New Drugs J* (中国新药杂志), 1999, 8(12): 802-806.
- [8] Chen Q H. Types and application of pellet preparing and coating equipments [J]. *Chin J Pharm* (中国医药工业杂志), 1996, 27(3): 134-139.

甲基茉莉酮酸对悬浮培养南方红豆杉细胞代谢的影响

王艳东,路明,元英进*

(天津大学化工学院 制药工程系,天津 300072)

摘要:目的 探讨甲基茉莉酮酸作用下悬浮培养南方红豆杉细胞的系列生理生化反应。方法 TTC(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride)和蛋白含量测定方法以及酶活分析技术。结果 甲基茉莉酮酸不仅强烈抑制细胞活力,使细胞初生代谢受到显著抑制,并且还诱导 PAL(苯丙氨酸解氨酶)活性增强,在一定程度上抑制了 PPO(多酚氧化酶)的活性,使胞外酚含量增加且极大峰比对照提前约 3 d 出现。结论 甲基茉莉酮酸不仅促进细胞由初生代谢提前向次生代谢转化,并且能够增强细胞的次生代谢,有利于细胞相关次生代谢产物的合成。

关键词: 南方红豆杉;紫杉醇;甲基茉莉酮酸;悬浮培养

中图分类号: R282.1; R286.0 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2003)01-0027-04

Cell metabolism of *Taxus chinensis* var. *mairei* in suspension cultures treated with methyl jasmonate

WANG Yan-dong, LU Ming, YUAN Ying-jin

(Department of Pharmaceutical Engineering, School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract Object To study the physiological changes of *Taxus chinensis* var. *mairei* (Lemee et Lévl.) Cheng et L. K. Fu in the case of methyl jasmonate (MJ). **Methods** TTC assay, soluble protein measurement and enzyme analysis were used. **Results** It was observed that MJ inhibited *Taxus* cell growth in the view of primary metabolism. MJ induced phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activity while it inhibited polyphenoloxidase (PPO) activity. Extracellular phenolic content after addition of MJ increased to the maximum at the three days than that of the control group. **Conclusion** It was demonstrated that MJ induced the transition of *Taxus* cell from primary metabolism to secondary metabolism. This is favorable for secondary metabolism of *Taxus* cells. It is important to study the physiology of *Taxus* cells for revealing the mechanism of MJ.

Key words *Taxus chinensis* var. *mairei* (Lemee et Lévl.) Cheng et L. K. Fu; taxol; methyl jasmonate (MJ); suspension culture

收稿日期: 2002-05-27

基金项目: 国家自然科学基金 (20176038); 杰出青年科学基金 B (20028607)

作者简介: 王艳东 (1974-), 女, 内蒙古呼和浩特人, 2000 年获天津大学化工学院生物化工专业工学硕士学位, 现攻读天津大学生化专业博士学位, 主要从事天然产物开发及植物细胞培养的研究。Tel (022) 27401642 E-mail: yandong.wang@eyou.com

* 通讯作者 Tel (022) 27401149 E-mail: yjyuan@public.tpt.tj.cn

自从 1977年紫杉醇 (taxol)特殊的抗癌机制被发现以来^[1],其较高的药用价值使需求量一直很大。但是,由于其自然资源缺乏,目前的人工合成步骤繁杂且产量低,其价格居高不下,严重限制了临床上的应用。因此,拓宽紫杉醇来源途径,提高紫杉醇产量,降低紫杉醇生产成本的研究尤为学术界关注。

植物细胞培养生产紫杉醇以其生长周期短、无污染、连续可供等优点,近年来成为研究热点^[2]。但研究中发现,该方法的难点在于细胞正常生长状态下很难大量合成紫杉醇。为解决此问题,采用适当方法影响细胞的正常生长状态,进而提高紫杉醇产量的研究成为必须。目前,在该过程中,添加生物或非生物诱导子的方法以其简捷、高效等优点,成为国内外众多研究者优先考虑和着重研究的方法^[3]。甲基茉莉酮酸 (methyl jasmonate, MJ)作为一种典型的非生物诱导子,由于其在紫杉醇生物合成中的显著作用更为研究者瞩目^[4]。已有研究表明 MJ作为一种重要的信号分子,在植物中影响细胞初生代谢的同时,还可诱导防御基因表达^[5]。而防御反应的发生与次生代谢紧密相关。考虑紫杉醇是红豆杉细胞的次生代谢产物,也是红豆杉细胞受外界刺激而发生防御反应时产生的一种植保素。因此考察 MJ作用下细胞相关生理生化反应的变化有利于揭示 MJ对细胞的诱导机制,进而指导紫杉醇的生物合成。但众多已报道的研究只是集中于其对紫杉醇合成产量的最终影响,很少涉及对细胞有关代谢及防御反应酶类等生理指标的影响研究。本研究选择南方红豆杉细胞为研究体系,考察了在 MJ作用下其初生代谢及与紫杉醇合成有关的其他次生代谢的生理生化指标,以期揭示 MJ对红豆杉细胞的生理作用机制,为指导紫杉醇的生物合成提供一些思路。

1 实验材料

研究用南方红豆杉 *Taxus chinensis* var. *mairei* T细胞系由中国科学院植物研究所提供。细胞接种于改良 B₆ 固体培养基上扩大培养后,接种于含 50 mL改良 B₆ 液体培养基的 250 mL锥形瓶中,25℃,110 r/min黑暗振荡培养 5代以上。选取长势良好细胞,继续培养,在第 7天加入诱导子 MJ,终浓度达 100 μmol/L;同时设立空白对照。在加入 MJ后 0, 2, 3, 4, 5, 6, 8 d取样。

2 方法与结果

2.1 细胞活力: 采用 TTC法 (氯化三苯四氮唑还原法)测定脱氢酶的活性作为细胞活力的判据^[6]。结果见图 1。在考察的前 4 d,对照组细胞活力呈上升

趋势,这是细胞处于指数生长期的表现;随后 3 d内,细胞活力维持较高水平,7 d之后由于细胞衰老表现为活力下降。与对照相比, MJ作用下的细胞活力明显偏低,且在本研究考察范围内,细胞活力变化幅度很小。分析认为,这是由于外加 MJ显著抑制了细胞生长所致。这与 Furmanowa 等人的研究结果一致^[5]。因此,推断在外源 MJ作用下,细胞初生代谢极有可能受到了明显的抑制。

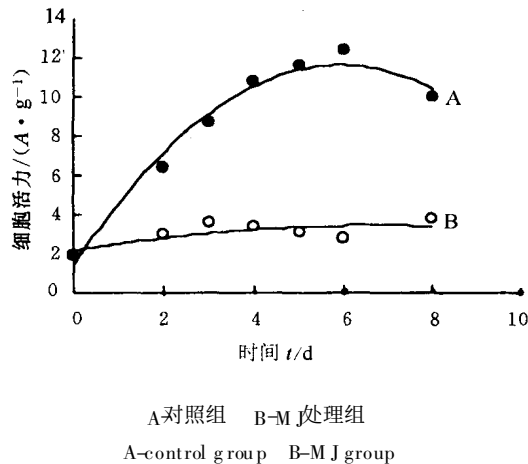
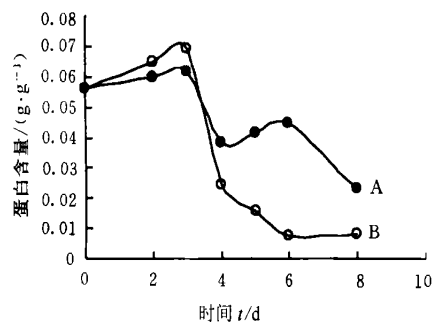


图 1 经 MJ处理的细胞活力变化曲线

Fig. 1 Cell viability curve after treatment with MJ

2.2 总蛋白含量: 有研究表明,在培养的细胞中细胞的生长、分裂与分化和可溶性蛋白含量的变化有紧密的联系,蛋白含量的增加与细胞的分裂有关^[7]。因此对细胞总蛋白含量的变化进行了考察。胞内外可溶性蛋白含量测定方法如下:抽滤红豆杉细胞悬浮培养物,收集滤液作为胞外待测液;称取 300 mg抽滤后鲜细胞,液氮冷冻,加入 0.01 g聚乙二醇烷酮和少量石英砂,4℃下充分研磨,加入 2 mL酶粗提液 (含 0.2 mol/L EDTA, 0.4 mmol/L二硫苏糖醇的 0.1 mol/L磷酸盐缓冲液),4℃下离心,取上清液为胞内待测液。考马斯亮蓝法测定蛋白质含量。细胞胞内、外总蛋白含量的变化见图 2。在考察的前 3 d,两组细胞蛋白含量几乎处于同一水平,第 3, 4天两组蛋白水平均下降。第 4天时,对照组水平不再降低,但经 MJ处理组的蛋白含量继续下降,在考察的第 4~ 8天,处理组蛋白含量明显低于对照。

对于对照组而言,在考察的前 3 d细胞一直处于指数生长前期 (图 1),细胞的初生代谢较为旺盛,使得蛋白合成速率与细胞总生物量增长速度几乎相等,因此在考察的前 3 d,总蛋白含量相对于细胞干重来说维持在较高水平。但随着细胞进入生长停滞期,细胞合成蛋白速率减慢,总蛋白含量下降。对于对照组而言,加入 MJ后细胞的刺激反应 (细胞信号



A-对照组 B-MJ处理组

A-control group B-MJ group

图 2 MJ处理后可溶性总蛋白含量变化

Fig. 2 Content curve of intracellular soluble total protein after treatment with MJ

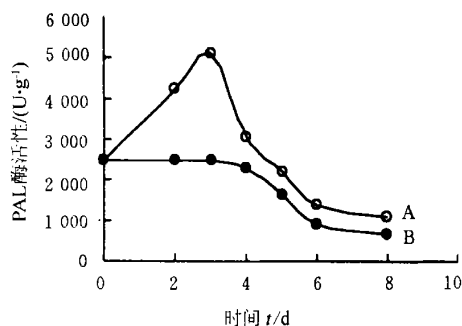
转导,基因启动以及蛋白的合成)表现出来需要一定的时间,因此在考察的前 3 d处理组未出现蛋白合成抑制现象,表现为蛋白含量与对照组几乎处于同一水平。3 d后,由于受到一定刺激,引发抗性反应的发生,细胞内要进行大量的蛋白更新^[8],表现为第 3~4 天蛋白含量的快速下降;在第 4~8 天,总蛋白含量低于对照,与 MJ抑制细胞活力相一致, MJ抑制了蛋白的合成。

综上,经 MJ处理的南方红豆杉细胞初生代谢和细胞分裂受到了明显抑制。

2.3 PAL(苯丙氨酸解氨酶)活性的变化: PAL活性测定方法如下:取 0.1 mL 胞内待测液,加入 2 mL 0.05 mol/L Tris-H₂SO₄缓冲液 (pH= 8.8)和 1 mL 0.02 mol/L 苯丙氨酸,混匀,290 nm 下测吸光度值 (A)。然后将溶液置于 30℃ 恒温水浴中反应 60 min,290 nm 下测 A₂₉₀ 以 $\Delta A_{290} / \Delta t = 0.1 / 60 \text{ min}$ 为一个酶活单位。

PAL是植物细胞中连接初生代谢和次生代谢的重要酶类,并且 PAL对紫杉醇的生物合成有一定的催化作用^[9]。因此,考察 PAL的活性有利于了解外源刺激下红豆杉细胞的代谢情况,以及外源刺激下抗性反应的发生情况。PAL的活性变化见图 3。

在考察的前 4 d,对照组 PAL的活性维持在较高水平;结合图 1可知,这一时期细胞正处于指数生长前期, PAL酶活性较为稳定。第 4~6 天,细胞正处于指数生长末期,细胞生长逐渐趋于稳定(图 1),在此期间, PAL活性经历一突变过程,这是初生代谢向次生代谢转化的表现。第 6 天后,细胞进入生长停滞期, PAL活性变化不大。经 MJ处理的处理组, PAL的活性呈先升后降趋势,在处理后的第 3 天达到最高水平且明显高于对照,表明 MJ对 PAL诱导



A-MJ处理组 B-对照组

A-MJ group B-control group

图 3 经 MJ处理后 PAL活性变化

Fig. 3 PAL activity after treatment with MJ

后,在第 3 天表达最强,极值峰的出现表明了 MJ在第 3 天发生了细胞由初生代谢向次生代谢的转化。

Gundlach 等^[5]研究表明 MJ对 PAL的最强诱导活性发生在诱导后的第 25 h 和第 33 h,可见不同细胞体系可有不同诱导效果。经 MJ处理后第 3~8 天 PAL呈下降趋势,推测 MJ对 PAL的诱导为短期行为,随着作用时间的延长,诱导作用逐渐减弱。由于苯丙烷途径是植物抗病原侵染的重要代谢途径,而 PAL又是这一途径的关键酶。因此,红豆杉细胞中 MJ诱导 PAL活性的增强表明红豆杉细胞经 MJ作用后抗病能力获得增强;同时 PAL又是紫杉醇侧链生物合成的重要酶类,所以 PAL活性的增强也是 MJ促进紫杉醇产量提高的原因之一。

2.4 胞外酚含量和胞外 PPO(多酚氧化酶)的变化: 酚类是细胞受到外界胁迫时所产生的的一种防御性次生代谢产物,它的产生有利于细胞次生壁木质素的沉积和合成相关次生代谢产物^[10]。因此,酚类物质的合成可反映细胞次生代谢的旺盛程度,相应的促进酚类物质的合成在一定限度内将有助于提高其他相关次生代谢产物的合成。但是酚类物质的过多累积会对细胞本身造成伤害。在实际过程中,细胞能够进行相应的自我调节,即将多余的酚类物质及时清除。PPO通常被认为是一种典型的酚类物质清除剂,它可将酚类物质转化为醌类,从而减轻酚类对细胞的伤害。进一步揭示其作用关系,有利于优化指导次生代谢产物紫杉醇的生物合成。

胞外酚测定方法如下:取 8 mL 培养基滤液,加入 10 mL 乙酸乙酯,超声,静置萃取 2 h,取 5 mL 上相(乙酸乙酯)组分蒸发干燥后,残留物溶于 3 mL 75% 乙醇,280 nm 下测量吸光度值,以 3 mL 75% 的乙醇为对照。胞外 PPO活性测定方法如下:比色皿中加入 1.5 mL 0.02 mol/L 邻苯二酚溶液和 1.5

mL 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH= 6.0), 再加入适量胞外待测液, 立即于 398 nm 下每隔 2 min 读数, 以 0.05 mol/L 的磷酸盐缓冲液为对照。以 $\Delta A_{398} \Delta t = 0.01/\text{min}$ 为一个酶活单位。MJ 作用下胞外酚和 PPO 活力的变化见图 4, 5

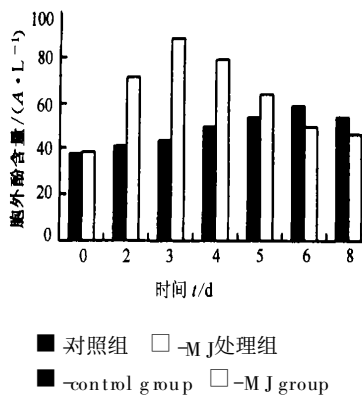


图 4 经 MJ 处理后的胞外酚含量的变化

Fig. 4 Content curve of extracellular phenol after treatment with MJ

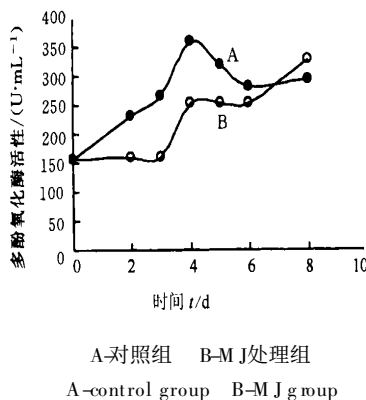


图 5 经 MJ 处理后 PPO 活性变化

Fig. 5 PPO activity after treatment with MJ

两组胞外酚含量均呈先升后降趋势。对照组在考察的第 6 天出现最高值, 而 MJ 处理组在处理后的第 3 天即出现最高值, 并且其胞外酚含量的极大值远高于对照。可见, 经 MJ 处理, 不仅使胞外酚含量增加, 且使胞外酚的大量合成提前到处理后第 3 天, 这与 PAL 被诱导后获得最大活性的时间相一致 (图 3)。这充分表明经 MJ 处理, 细胞不仅次生代谢被加强, 而且使细胞由初生代谢向次生代谢的转化提前。由图 5 可见, 在考察范围内对照组 PPO 活力随时间呈先升后降趋势, 在第 4 天达到最高水平; 经 MJ 作用后, PPO 活性呈逐渐上升趋势。但 MJ 处理后 PPO 整体水平低于对照, 说明 MJ 作用下 PPO 活性受到一定抑制作用。结合图 4, 推测 MJ 作用下 PPO 的作用底物胞外酚的大量积累可能是抑制 PPO 活性的主要原因。大量酚类积累可能使细胞来不及合

成足够 PPO 用以消除酚类毒性。因此, 对酚类物质的消除作用减弱, 这可能也是细胞经 MJ 处理后褐化的主要原因之一。

3 结论

MJ 作为一种信号分子, 它可启动多种基因表达, 由此可促进多种次生代谢产物的生成^[11], 但其对红豆杉细胞的诱导机制尚不明确。本研究从细胞活力、蛋白含量及与次生代谢和抗性反应相关的酶等指标出发, 初步探讨了 MJ 对南方红豆杉细胞中与代谢相关的生理态势的影响。结果表明 MJ 明显抑制了细胞活力, 对细胞的初生代谢造成了不良影响; MJ 可促使细胞从初生代谢向次生代谢提前转化, 且可增强次生代谢的进行, 这也是 MJ 促进紫杉醇产量提高的原因之一; MJ 的作用使细胞消除胞外酚的伤害能力减弱, 推测这是细胞经 MJ 处理后细胞褐化的原因之一。因此, 本研究结果提示我们用 MJ 诱导南方红豆杉细胞, 提高其次生代谢产物紫杉醇的同时, 采取相应措施 (比如加入抗氧化或抗衰老物质) 消除大量酚累积对细胞的伤害是必需的。

References

- [1] Fuchs D A, Johnson R K. Cytologic evidence that taxol, an antineoplastic agent, from *Taxus brevifolia*, acts as a mitotic spindle poison [J]. *Cancer Treat Rep*, 1978, 62: 1219-1223.
- [2] Cusi R M, Palam J, Navia-Osorio A, et al. Production of taxol and baccatin III by a selected *Taxus baccata* callus line and its derived cell suspension culture [J]. *Plant Sci*, 1999, 146: 101-107.
- [3] Yuan Y J, Li C, Hu Z D, et al. Signal transduction pathway for oxidative burst and taxol production in suspension cultures of *Taxus chinensis* var. *mairei* induced by oligosaccharide from *Fusarium oxysporum* [J]. *Enzyme Microb Technol*, 2001, 29: 372-379.
- [4] Mirjalili N, Linden J C. Methyl jasmonate induced production of taxol in suspension cultures of *Taxus cuspidate* ethylene interaction and induction models [J]. *Biotechnol Prog*, 1996, 12: 110-118.
- [5] Gundlach H, Muller M, Kutchan T, et al. Jasmonate acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 2389-2393.
- [6] Iborra J L, Guardiola J, Montaner S, et al. 2, 3, 5-Triphenyltetrazolium chloride as a viability assay for immobilized plant cells [J]. *Biotechnol Tech*, 1992, 6: 319-322.
- [7] Meng Z Q, Geng H. Progress of the proteins relating to mitochondrial fission [J]. *Chem Life* (生命的化学), 2002, 22: 118-120.
- [8] Creelman R A, Mellott J E. Biosynthesis and action of jasmonates in plant [J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1997, 48: 355-381.
- [9] Leete E, Bodem G B. The biosynthesis of 3-dimethylamino-3-phenylpropanoic acid in yew [J]. *Tetrahedron Lett*, 1966, 33: 3925-3927.
- [10] McCue P, Zheng Z X, Pinkham J L, et al. A model for enhanced pea seedling vigour following low pH and salicylic acid treatment [J]. *Proc Biochem*, 2000, 35: 603-613.
- [11] Choi D, Bostock R M, Avdiushko S, et al. Lipid-derived signals that discriminate wound- and pathogen-responsive isoprenoid pathways in plants [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 96: 2329-2333.